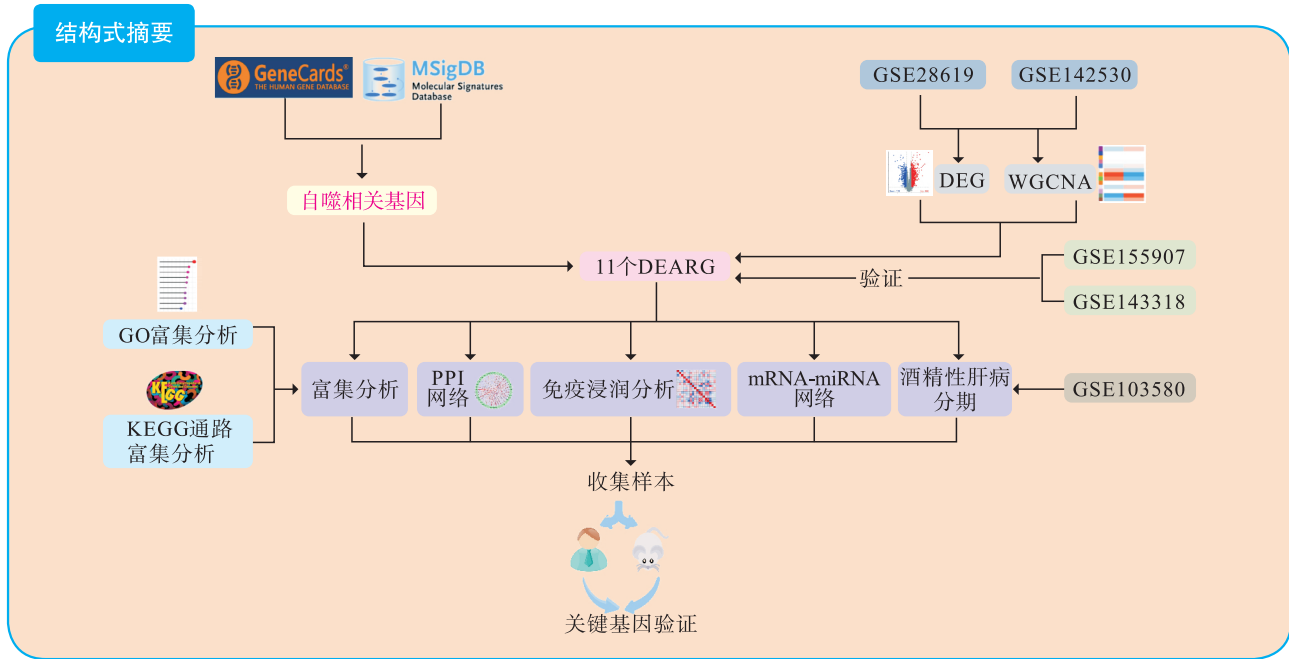


酒精性肝炎自噬关键基因的筛选及生物信息学分析

袁超 练庆海 尼贝贝 许燕 张彤 张剑



【摘要】 目的 筛选酒精性肝炎（AH）的自噬关键基因，探讨 AH 潜在的生物标志物和治疗靶点。方法 采用基因表达综合数据库（GEO）中的 2 个 AH 基因芯片和从 MSigDB、GeneCards 数据库中获得的自噬相关数据集，通过加权基因共表达网络分析（WGCNA）获取关键基因。对筛选的关键基因进行基因本体（GO）、京都基因和基因组百科全书（KEGG）功能富集分析，蛋白质相互作用（PPI）分析，免疫浸润分析，构建信使 RNA（mRNA）-微小 RNA（miRNA）网络，进行酒精性肝病不同分期的自噬相关关键基因的表达差异分析，并进一步通过实时荧光定量逆转录聚合酶链反应（RT-qPCR）在 AH 患者和小鼠肝脏组织中验证。结果 本研究筛选得到了 11 个与 AH 自噬相关的基因（EEF1A2、CFTR、SOX4、TREM2、CTHRC1、HSPB8、TUBB3、PRKAA2、RNASE1、MTCL1、HGF），均为上调基因。在 AH 患者和小鼠肝脏组织中，SOX4、TREM2、HSPB8、PRKAA2 在 AH 组中的相对表达量均高于对照组。结论 SOX4、TREM2、HSPB8、PRKAA2 可能是 AH 潜在的生物标志物和治疗靶点。

【关键词】 酒精性肝炎；自噬；关键基因；生物信息学；加权基因共表达网络分析（WGCNA）；基因本体（GO）；京都基因和基因组百科全书（KEGG）；蛋白质相互作用（PPI）

【中图分类号】 R617, R318.04 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-7445（2024）01-0012-12

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2023163

基金项目：广东省自然科学基金面上项目（2019A1515011850、2022A1515012224）

作者单位：510630 广州，中山大学附属第三医院肝胆外科暨肝移植中心（袁超、张彤、张剑），疫苗研究所（练庆海、尼贝贝），生物治疗中心（许燕）

作者简介：袁超（ORCID 0009-0001-2728-7174），硕士研究生，研究方向为肝移植，Email: yuanch26@mail2.sysu.edu.cn

通信作者：张彤（ORCID 0000-0001-7602-3856），博士，主任医师，研究方向为肝移植，Email: zhjef72@sina.com

Screening and bioinformatics analysis of key autophagy-related genes in alcoholic hepatitis Yuan Chao*, Lian Qinghai, Ni Beibei, Xu Yan, Zhang Tong, Zhang Jian. *Department of Hepatic Surgery, Liver Transplantation Center, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China
Corresponding author: Zhang Tong, Email: zhjeff72@sina.com

【 Abstract 】 Objective To screen key autophagy-related genes in alcoholic hepatitis (AH) and investigate potential biomarkers and therapeutic targets for AH. **Methods** Two AH gene chips in Gene Expression Omnibus (GEO) and autophagy-related data sets obtained from MSigDB and GeneCards databases were used, and the key genes were verified and obtained by weighted gene co-expression network analysis (WGCNA). The screened key genes were subject to gene ontology (GO), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), protein-protein interaction (PPI) and immune infiltration analyses. Messenger RNA (mRNA)- microRNA (miRNA) network was constructed to analyze the expression differences of key autophagy-related genes during different stages of AH, which were further validated by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) in the liver tissues of AH patients and mice. **Results** Eleven autophagy-related genes were screened in AH (EEF1A2, CFTR, SOX4, TREM2, CTHRC1, HSPB8, TUBB3, PRKAA2, RNASE1, MTCL1 and HGF), all of which were up-regulated. In the liver tissues of AH patients and mice, the relative expression levels of SOX4, TREM2, HSPB8 and PRKAA2 in the AH group were higher than those in the control group. **Conclusions** SOX4, TREM2, HSPB8 and PRKAA2 may be potential biomarkers and therapeutic targets for AH.

【 Key words 】 Alcoholic hepatitis; Autophagy; Key gene; Bioinformatics; Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA); Gene ontology (GO); Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG); Protein-protein interaction (PPI)

酒精性肝炎 (alcoholic hepatitis, AH) 是酒精性肝病的急性临床表现^[1], 其发病机制由多种因素造成, 除遗传因素外, 也与酒精诱导的肝损伤、活性氧、脂肪变性、炎症等有关^[2-5]。持续的慢性肝损伤会导致肝纤维化、肝硬化和肝衰竭^[6-8], 最终可能发展为肝癌^[9]。戒酒是 AH 的最佳治疗方法^[10], 如继续进展至肝硬化或肝癌等晚期疾病, 可能需要肝移植^[11]。早期肝移植可以提高药物治疗无效的重度 AH 患者的生存率, 但高昂的手术费用及术后很可能恢复饮酒习惯使得患者施行肝移植手术的意愿低^[12]。因此, 迫切需要探索新的 AH 治疗方法。

自噬在维持细胞内稳态、清除老化或异常细胞成分等方面发挥着重要的作用^[13-17], 从而影响细胞代谢、免疫调节、细胞凋亡和疾病的发生与发展^[18]。自噬在清除肝细胞中的脂滴方面起着关键作用^[19], 长期饮酒会抑制自噬, 从而降低脂质清除率^[20]。而急性酒精摄入可能会激活自噬, 进而去除受损的线粒体和积累的脂肪酸^[21]。这意味着对 AH 患者来说, 自噬对减少酒精带来的肝损伤至关重要^[22], 增强自噬可能是 AH 的治疗策略^[23]。然而自噬与酒精性肝炎之间的具体调控机制尚未明确。本研究拟通过生物信息学的方法, 将酒精性肝炎和自噬进行交叉分析, 筛选出与

AH 自噬相关的基因^[24], 探讨能预测 AH 患者预后的生物标志物及治疗靶点^[25], 旨在为改进 AH 的诊断、疾病风险预测以及个性化治疗方案制定提供了新的视角及解决方案。

1 材料与方法

1.1 AH 芯片数据源

笔者从基因表达综合 (Gene Expression Omnibus, GEO) 数据库官方网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 下载了 AH 芯片数据集 (GSE28619、GSE142530) 及其对应的临床数据文件。GSE28619 包含 22 个样本的基因表达谱, 包括 15 个 AH 样本和 7 个正常肝脏样本, GSE142530 包含 28 个样本, 包括 10 个 AH 样和 12 个正常肝脏样本, 以及 6 个肝硬化样本。

1.2 生物信息学分析方法

1.2.1 基因表达差异分析 通过 GEO2R 工具进行分析。将 $|\log_2FC| > 1$ 且 $P < 0.05$ 的基因被视为差异表达基因 (differentially expressed gene, DEG)。从 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 和 MSigDB (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb>) 数据库下载分别得到 10 392 个和 646 个自噬相关基因 (autophagy-related gene, ARG)。DEG 和 ARG 之

间一致的基因被鉴定为差异性表达的自噬相关基因 (differentially expressed autophagy-related gene, DEARG)。使用 R 软件 (版本 3.6.3) 创建热图、火山图。

1.2.2 加权基因共表达网络分析 利用 R 软件构建 AH 的加权基因共表达网络分析 (weighted gene co-expression network analysis, WGCNA) 表达矩阵。为综合考虑 WGCNA 筛选的与 AH 相关的基因、DEG 和 ARG, 使用韦恩图分析这三者之间的共同基因。最终获取了与 AH 显著相关的 11 个关键自噬相关基因 (hub 基因)。

1.2.3 关键基因蛋白质相互作用网络的构建 为了深入研究这 11 个自噬基因的功能网络, 采用 TRING 数据库 (<https://string-db.org/>), 借助 R 软件包构建了自噬基因的蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络。

1.2.4 基因本体和京都基因与基因组百科全书通路富集分析 使用 R 软件进行基因本体 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析。校正后的 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

1.2.5 免疫浸润分析 通过使用 CIBERSORT 算法来计算每个样本中 T 细胞亚群、B 细胞、巨噬细胞等免疫细胞类型的比例。通过使用 ssGSEA 算法来计算每个样本中免疫相关基因集的富集得分, 从而了解免疫细胞在样本中的整体活性。在完成 CIBERSORT 和 ssGSEA 计算后, 进行了相关性分析、差异分析等, 以探究免疫浸润与自噬基因之间的关联。

1.2.6 自噬相关基因的验证以及 AH 不同进展程度的分析 通过使用两个公共基因表达数据集 GSE155907 和 GSE143318 来验证本研究筛选的 11 个自噬基因的差异表达情况, 用于探究自噬基因在 AH 中的变化。通过使用 GSE103580 数据集来对 11 个自噬基因在 AH 不同进展程度中的表达进行分期, 研究 11 个自噬基因在不同分期中的表达变化。使用 Mann-Whitney U 检验和可视化工具来分析 GSE155907、GSE143318 和 GSE103580 的数据, 并进一步探究 11 个自噬基因在 AH 中的表达特征和与进展程度的关联。

1.2.7 mRNA-miRNA 调控网络的构建 使用 miRNet 2.0 (<https://www.mirnet.ca/>) 预测免疫相关基因与其靶微小 RNA (microRNA, miRNA, miR) 和转录因

子 (transcription factor, TF) 之间的相互作用。然后建立信使 RNA (messenger RNA, mRNA) -miRNA 和 mRNA-TF 调控网络来描述 mRNA、miRNA 和 TF 之间的相互作用, 作为 AH 细胞的潜在靶点。最后使用 mirPathv.3 数据库对这些预测得到的 miRNA 进行富集分析。

1.2.8 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 提取总 RNA 并使用逆转录试剂盒逆转录成互补 DNA (complementary DNA, cDNA)。根据实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 试剂盒说明书进行 RT-qPCR。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 mRNA 的相对表达水平。

1.3 样本来源及主要试剂

1.3.1 样本来源 选取 5 例 AH 患者病肝和 6 例健康供肝标本。入选标准: 2022 年 1 月 1 日至 2023 年 6 月 30 日在中山大学附属第三医院肝移植科进行非活体肝移植手术的受者及对应供者, 受者年龄 18~75 岁。排除标准: 供者 ≥ 75 岁、重度脂肪变性供肝肝移植以及亲属活体肝移植。采样已获得中山大学附属第三医院伦理审查委员会的批准 (伦理号: 中大附三医伦 [2022]02-122-01)。所有参与研究的患者签署了知情同意书。

无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级 6~8 周龄 C57BL/6J 雌性小鼠购买自广东药康生物科技有限公司。AH 模型小鼠构建参考文献 [26], 通过检测各项指标 (肝脏指数、肝功能指标、肝组织脂质代谢指标、肝组织病理学观察等) 确认造模成功^[26], 选取 8 例 AH 模型小鼠和 8 例正常小鼠的肝脏样本。动物实验已获得中山大学附属第三医院伦理审查委员会的批准 (批准号: IACVC-F3-20-6517)。

1.3.2 主要试剂 逆转录试剂盒 (湖南艾科瑞生物工程有限公司, AG11711); RT-qPCR 试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司, Q711-02)。

1.4 统计学方法

采用 R 软件 (版本 4.1.3) 进行统计学分析。符合正态分布的计量资料采用均数 \pm 标准差表示, 组间比较采用 t 检验; 不符合正态分布的计量资料采用中位数 (下四分位数, 上四分位数) 表示, 组间比较采用 Mann-Whitney U 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

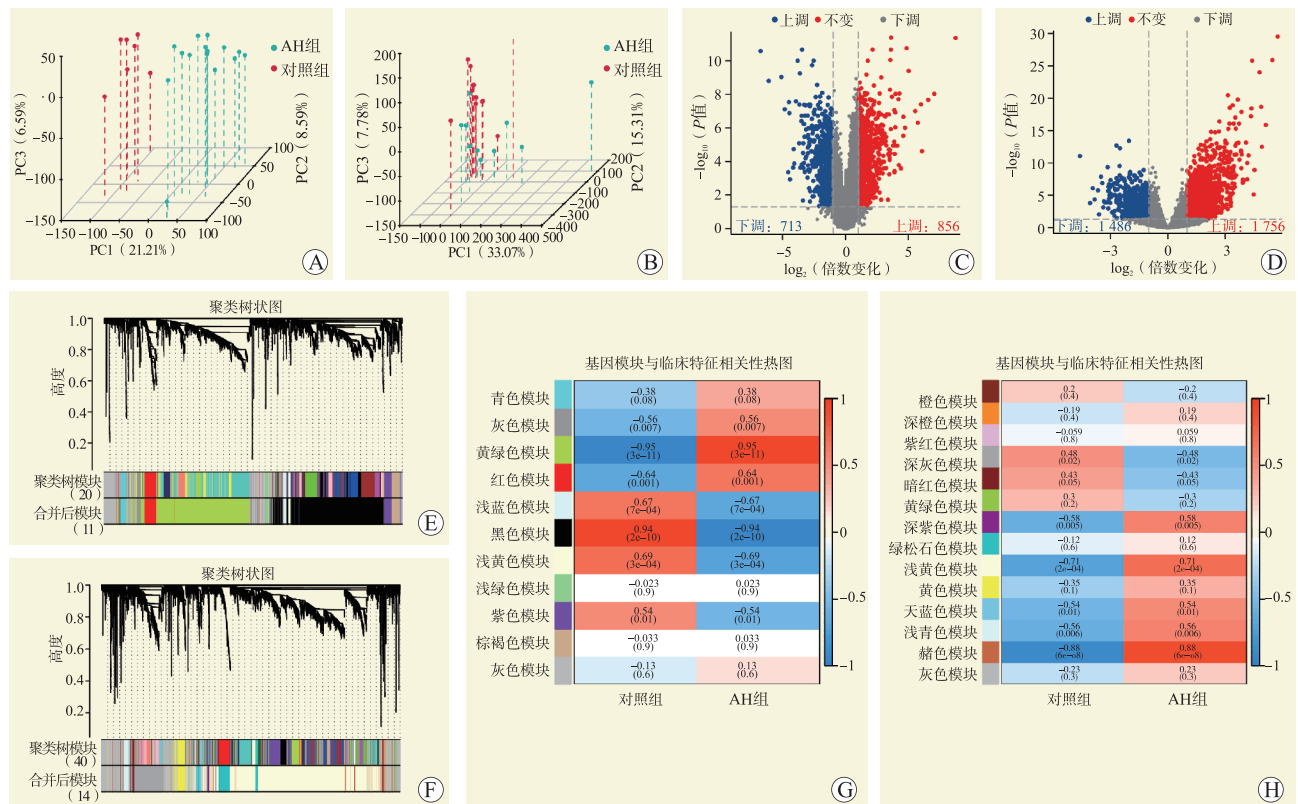
2.1 DEARG 的鉴定

为了评估组内数据的重复性,对 GSE28619、GSE142530 数据集进行主成分分析 (principal component analysis, PCA),结果显示数据的重复性良好 (图 1A、B)。差异表达分析显示,在 GSE28619 中 AH 组与对照组共有 1 569 个 DEG,其中 856 个基因上调,713 个基因下调 (图 1C);在 GSE142530 中 AH 组与对照组共有 3 242 个 DEG,其中 1 756 个基因上调,1 486 个基因下调 (图 1D)。同时,对这两个数据集进行 WGCNA,图 1E、F 和图 1G、H 分别为基因的聚类树状图和基因模块与临床特征相关热图。动态树切割算法分别识别出 11 个和 14 个基因模块 (图 1G、H),在图 1G 中黄绿色和红色模块与 AH 高度相关 ($|R|>0.6, P<0.01$),在图 1H 中赭色和浅黄色模块与 AH 高度相关 ($|R|>0.6, P<0.001$),

因此将这 4 个模块中的基因视为 AH 相关基因。

2.2 AH 中 ARG 的鉴定和富集分析

从 GeneCards 和 MSigDB 数据库分别下载 10 392 个和 646 个 ARG,与 DEG 和 WGCNA 结果取交集,分析鉴定了 11 个表达一致上调的 DEARG (EEF1A2、CFTR、SOX4、TREM2、CTHRC1、HSPB8、TUBB3、PRKAA2、RNASE1、MTCL1、HGF),绘制了韦恩图 (图 2A)。11 个 DEARG 在 GSE28619 和 GSE142530 中的表达热图分别见图 2B、C,11 个 DEARG 在染色体上的位置见图 2D。获得 11 个 DEARG 后,在 STRING 数据库中构建一个包含这 11 个基因的 PPI 网络以探索它们之中潜在的相互作用 (图 2E)。KEGG 通路富集分析结果显示,主要涉及的信号通路是叉头盒蛋白 O (forkhead box protein O, FoxO) 信号通路、Apelin 信号通路、磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)-蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通



注: A 图为 GSE28619 的 PCA 结果; B 图为 GSE142530 的 PCA 结果; C 图为火山图显示 GSE28619 中的 DEG; D 图为火山图显示 GSE142530 中的 DEG; E 图为 GSE28619 数据集中所有基因的树状图基于不同度量聚类 (1-TOM); F 图为 GSE142530 数据集中所有基因的树状图基于不同度量聚类 (1-TOM); G 图为 GSE28619 数据集中基因聚类模块与 AH 相关性的热图; H 图为 GSE142530 数据集中基因聚类模块与 AH 的热图。

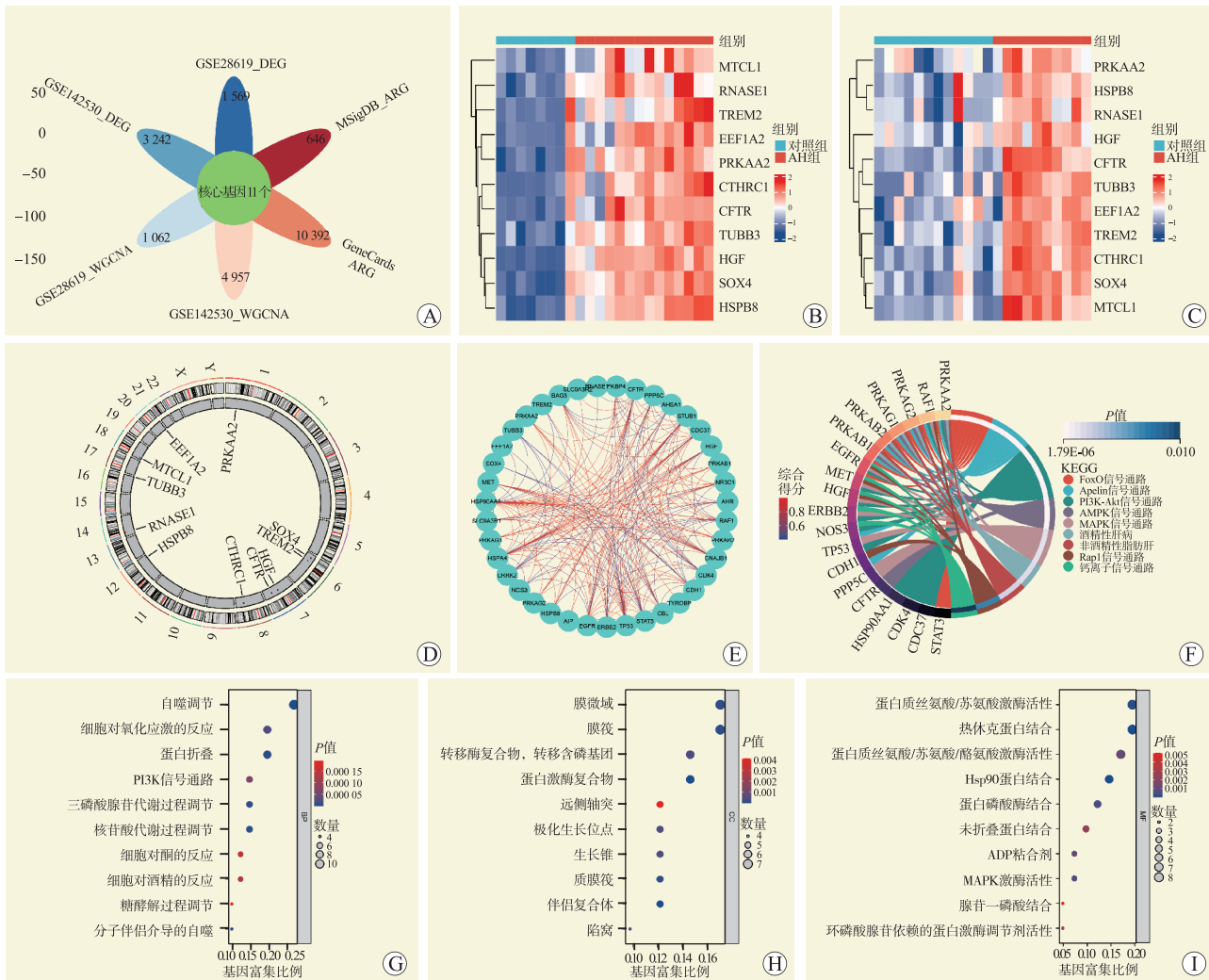
图 1 AH 相关关键基因的筛选

Figure 1 Screening of key genes associated with AH

路、腺苷酸活化蛋白激酶（adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK）信号通路、丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase, MAPK）信号通路、酒精性肝病、非酒精性脂肪肝、Rap1 信号通路和钙离子信号通路（图 2F）。在 GO 生物过程类别中，大多数 DEARG 主要参与自噬调节、细胞对氧化应激的反应、蛋白折叠等（图 2G）。在 GO 细胞组分类别中，大多数 DEARG 富集在膜微域和膜筏中（图 2H）。在 GO 分子功能类别中，多数 DEARG 富集在蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性、热休克蛋白结合、蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性等（图 2I）。

2.3 免疫浸润分析

通过计算每个样本中免疫相关基因集的富集得分，可以充分了解到免疫细胞在样品中的整体活性。样品的 24 个免疫细胞的比例见图 3A，各免疫细胞之间的相关性见图 3B，其中辅助性 T 细胞（helper T cell, Th）17、CD8⁺T 细胞与 Th 高度相关，嗜酸性粒细胞与 B 细胞高度相关，细胞毒性 T 细胞、T 细胞与 $\gamma\delta$ T 细胞高度相关，中性粒细胞与 Th1 高度相关。在 AH 组中，有较高比例的未成熟树突状细胞，而 CD8⁺T 细胞、细胞毒性 T 细胞、嗜酸性粒细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞和 Th17 比例较低（图 3C）。通过 Spearman 相关系数揭示了免疫细胞的丰度和 hub 基



注：A 图为 AH 和自噬相关基因的重叠的韦恩图；B 图为 GSE28619 中 DEARG 的热图；C 图为 GSE142530 中 DEARG 的热图；D 图示 DEARG 在染色体上的位置；E 图为 PPI 图；F 图为 KEGG 相关通路分析；G、H、I 图分别示生物过程、细胞组分、分子功能的 KEGG 分析。

图 2 AH 中 ARG 的筛选及功能分析

Figure 2 Screening and functional analysis of ARG associated with AH

因表达之间的关系, 结果表明 B 细胞、CD8⁺T 细胞、细胞毒性 T 细胞、嗜酸性粒细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞和 Th17 与 hub 基因呈负相关, 未成熟树突状细胞与 hub 基因呈正相关 (图 3D)。

与此同时, 本研究也通过 CIBERSORT 算法计算 AH 中各种免疫细胞类型的相对丰度, 以期得到更完善的结果。样品的 22 个免疫细胞的比例见图 4A。各免疫细胞之间的相关性见图 4B, 其中活化肥大细胞与静息肥大细胞高度相关, M1 型巨噬细胞与 $\gamma\delta$ T 细胞高度相关。在 AH 组中, 有较高比例的静息肥大细胞和 M0 型巨噬细胞, 并且 $\gamma\delta$ T 细胞比例较低 (图 4C)。通过 Spearman 相关系数揭示了免疫细胞的丰度和 hub 基因表达之间的关系 (图 4D), 结果表明 CFTR、HSPB8、TUBB3、HGF 基因与 $\gamma\delta$ T 细胞呈负相关, EEF1A2、CFTR、SOX4、TREM2、

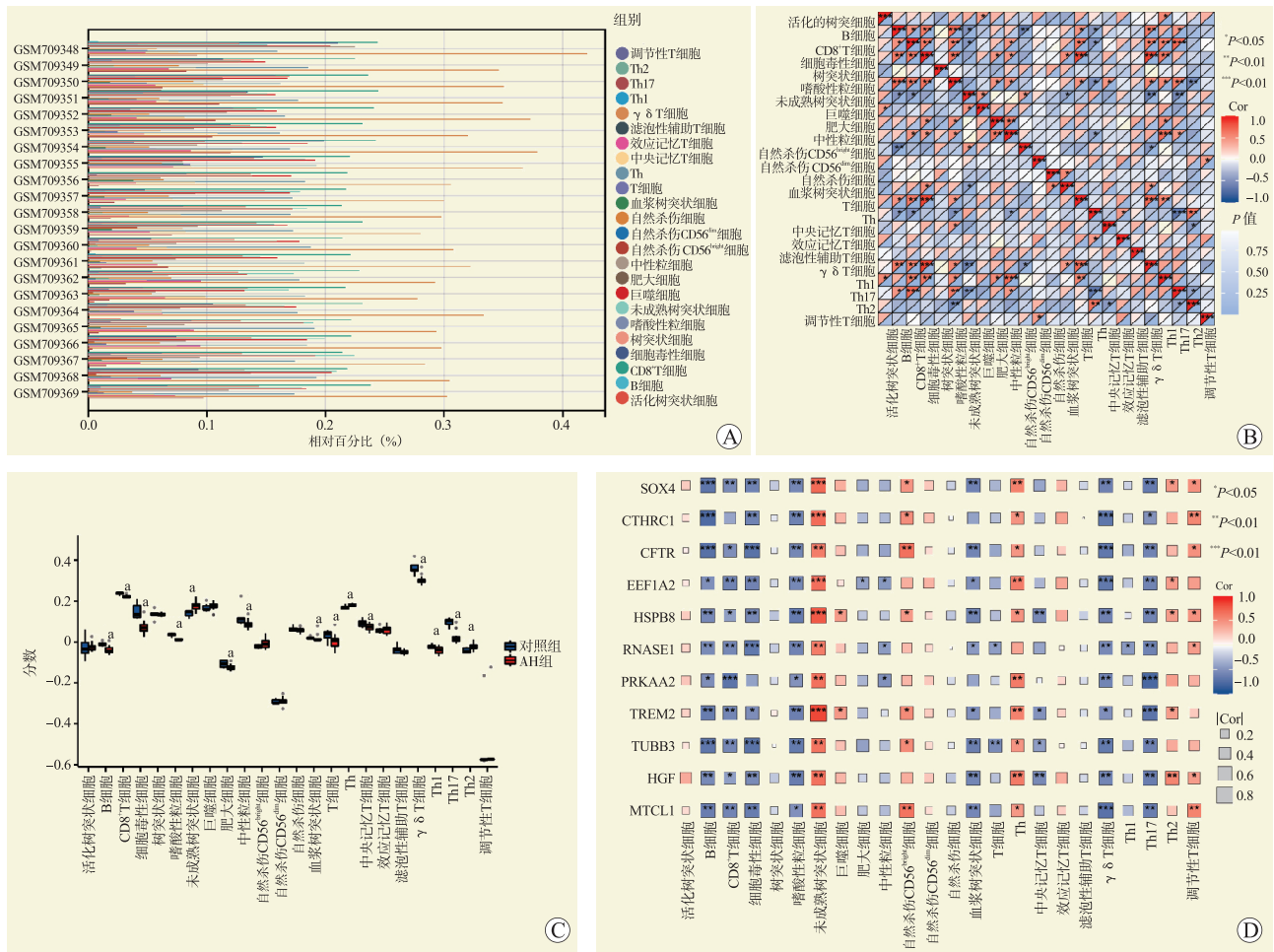
CTHRC1、HSPB8、TUBB3、PRKAA2、RNASE1、HGF、MTCL1 基因与 M0 型巨噬细胞呈正相关, 静息树突状细胞与 EEF1A2、PRKAA2 基因呈正相关, 静息肥大细胞与 TUBB3 基因呈正相关, 活化肥大细胞与 EEF1A2、TREM2、TUBB3 基因呈负相关。

2.4 数据集验证

用 GSE155907 和 GSE143318 作为验证集, 为了评估组内数据的重复性, 在本研究中对 2 个数据集进行 PCA, 结果显示数据的重复性良好 (图 5A、D)。11 个关键基因均为上调基因 (图 5B、E), 且在 AH 组中表达量高于对照组 (图 5C、F)。

2.5 临床相关性分析

为了探究 hub 基因在不同进展阶段的酒精性肝病中的表达关系, 用 GSE103580 数据集 (不包含 TUBB3 基因) 进行验证, 数据集中包含了不同进展



注: A 图为每个样本中免疫细胞含量叠加图; B 图示免疫细胞之间的相关性; C 图为免疫细胞含量直方图, 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; D 图为 AH 患者中的 11 个关键基因与免疫细胞含量的相关性分析, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 3 免疫浸润分析-ssGSEA 算法

Figure 3 Immune infiltration analysis-ssGSEA algorithm

阶段的酒精性脂肪肝、急性 AH 和酒精性肝硬化的患者样本。分析发现 CFTR、HGF、HSPB8、SOX4、MTCL1、PRKAA2、RNASE1、TREM2 基因在酒精性肝病的不同进展阶段有不同的表达水平，除 TREM2 基因外，其余的基因在酒精性肝硬化阶段的表达量最高，且 CFTR 和 PRKAA2 基因在酒精性肝硬化比在 AH 阶段的表达大幅度增高，提示其在酒精性肝硬化的发展中发挥着重要作用（图 5G~P）。

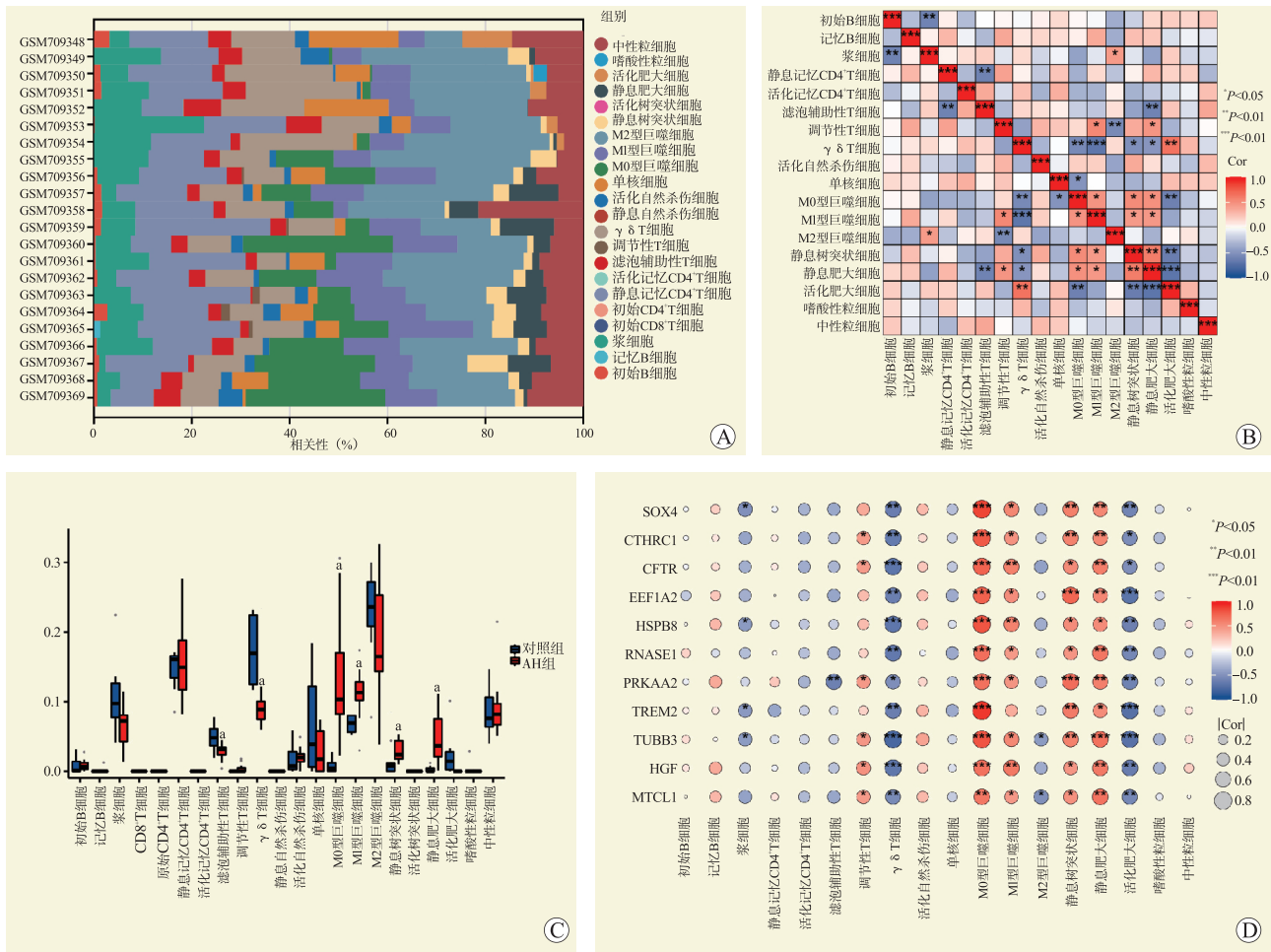
2.6 mRNA-miRNA、mRNA-TF 网络的构建

采用 miRNet 2.0 数据库对肝脏中的 11 个基因进行了 miRNA 和 TF 的预测。mRNA-miRNA 和 mRNA-TF 网络分析表明这 11 个基因共调控了 56 个 miRNA 和 24 个 TF（图 6A），且 HSPB8、CTHRC1、PRKAA2、EEF1A2、MTCL1、SOX4 等基因都可能与 hsa-miR-124-3p（又称 hsa-let-7b-5p）存

在调控关系。使用 mirPath v.3 数据库对这些预测得到的 miRNA 进行富集分析，以进一步深入了解这些 miRNA 在调控网络中的功能作用（图 6B），结果表明，这些 miRNA 在多个信号通路中富集，其中包括 FoxO 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、转化生长因子（transforming growth factor, TGF）-β 信号通路以及与脂肪酸代谢相关的通路。

2.7 RT-qPCR 验证

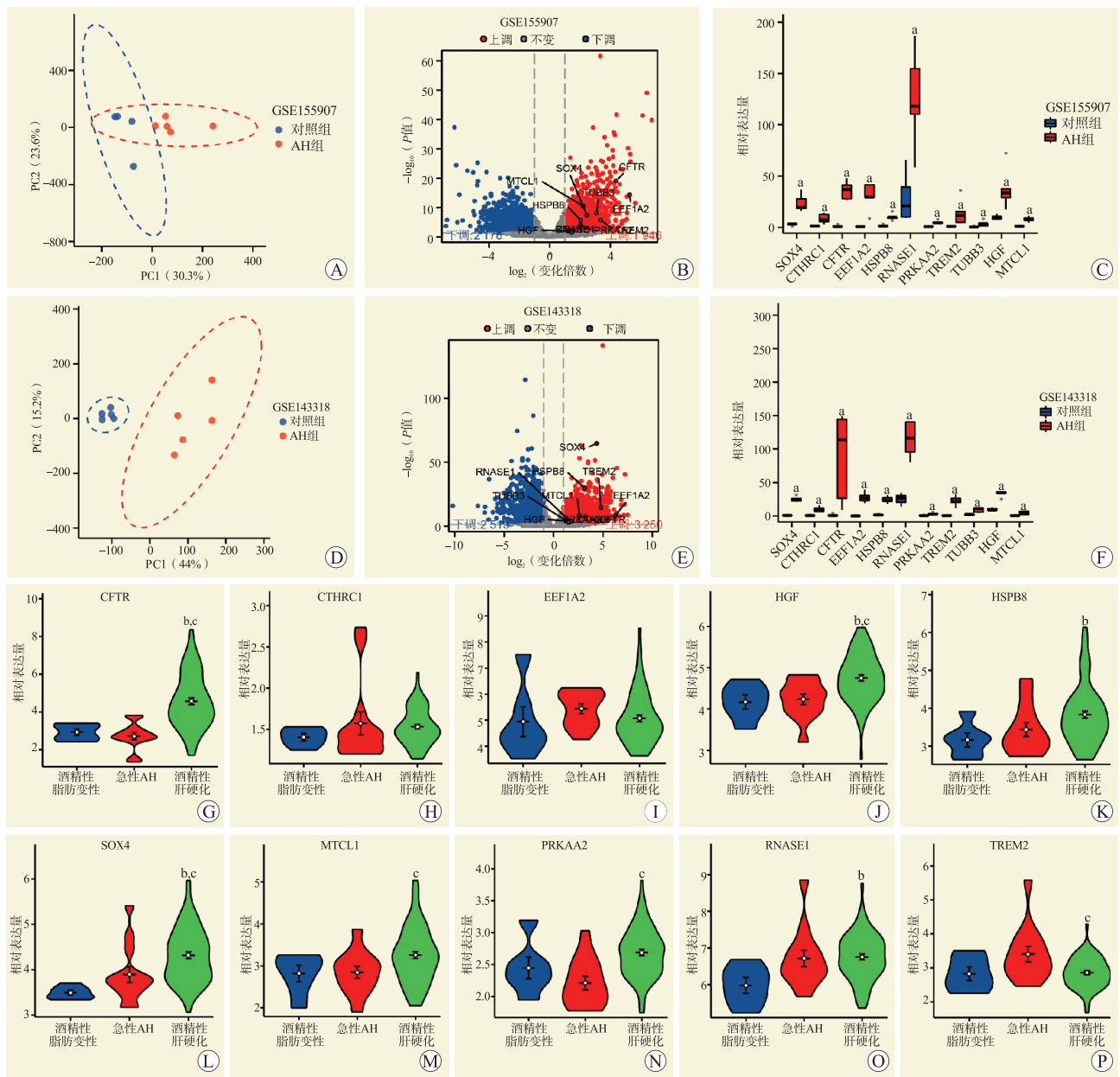
为了进一步验证以上分析结果，本研究收集 5 例 AH 患者病肝和 6 例健康供肝的肝脏组织，通过 RT-qPCR 检测 EEF1A2、CFTR、SOX4、TREM2、CTHRC1、HSPB8、TUBB3、PRKAA2、RNASE1、MTCL1、HGF 基因的相对表达量，图 7A 结果显示 SOX4、TREM2、CTHRC1、HSPB8、TUBB3、



注：A 图为每个样本中免疫细胞含量叠加柱状图；B 图示免疫细胞之间的相关性；C 图为免疫细胞含量直方图，与对照组比较，^a $P < 0.05$ ；D 图为 AH 患者中的 11 个关键基因与免疫细胞含量的相关性分析，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ 。

图 4 免疫浸润分析-CIBERSORT 算法

Figure 4 Immune infiltration analysis-CIBERSORT algorithm



注：A 图为 GSE155907 数据集 PCA 的结果图；B 图示 GSE155907 数据集火山图验证了 11 个基因均上调；C 图为 GSE155907 数据集中 11 个基因表达情况箱形图；D 图为 GSE143318 数据集 PCA 的结果图；E 图示 GSE143318 数据集火山图验证了 11 个基因均上调；F 图为 GSE143318 数据集中 11 个基因表达情况箱形图；G~P 图示酒精性肝病不同分期的 10 种 hub 基因表达；与对照组比较，^a $P < 0.05$ ；与酒精性脂肪变性比较，^b $P < 0.05$ ；与急性 AH 比较，^c $P < 0.05$ 。

图 5 GSE155907、GSE143318 数据集验证和 AH 不同分期的基因表达

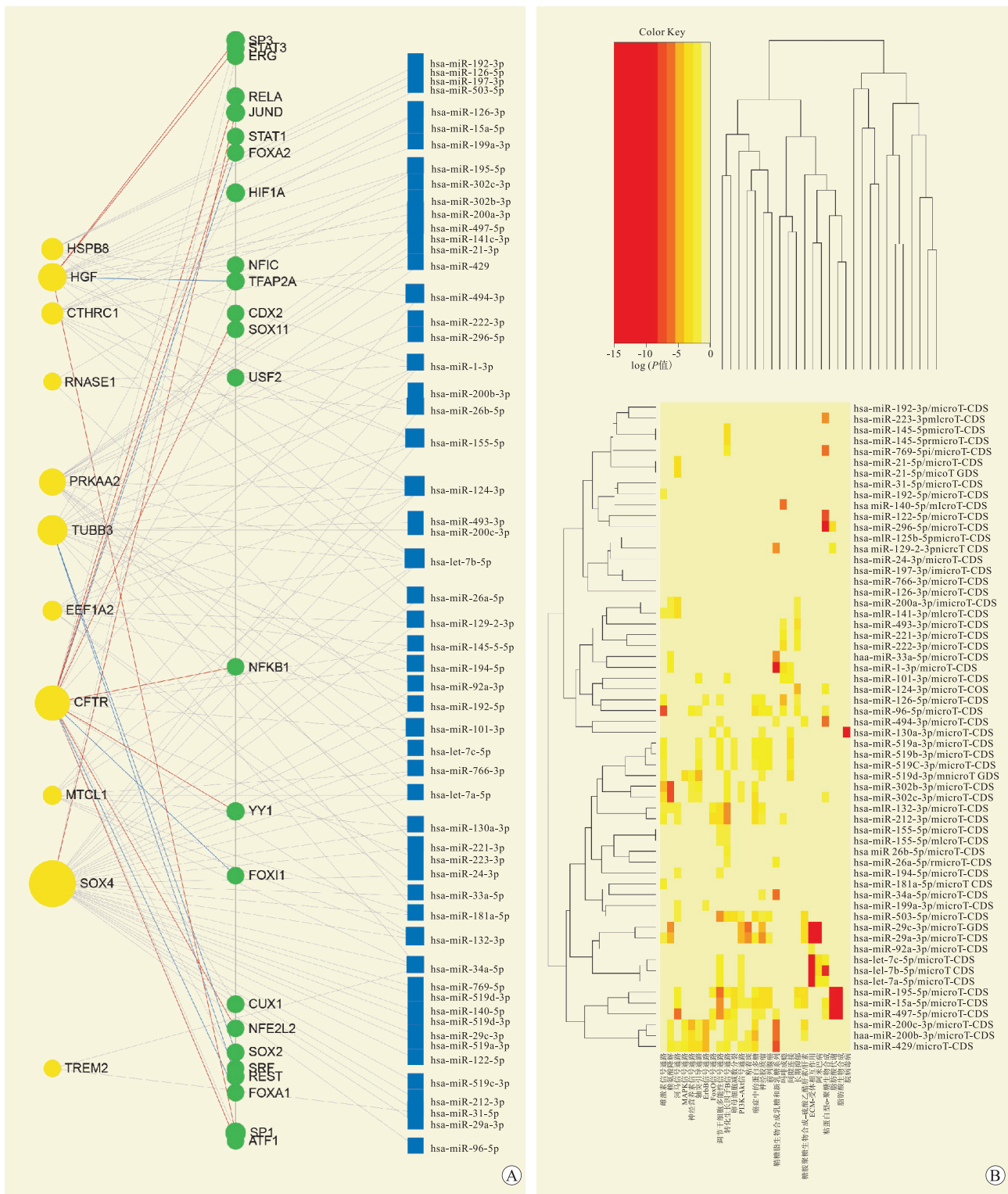
Figure 5 Datasets validation of GSE155907 and GSE143318 and gene expression of AH at different stages

PRKAA2、RNASE1 与生物信息学分析结果一致，在 AH 患者肝脏组织中的相对表达量高于健康对照组。同时，本研究也利用 AH 小鼠来验证上述 7 个基因的表达趋势，结果显示 SOX4、TREM2、HSPB8、PPKAA2 基因在 AH 小鼠中的相对表达量高于健康对照小鼠（图 7B）。

3 讨论

自噬在酒精性肝损伤中发挥着重要作用，可能成为治疗 AH 的一个潜在靶点。本文从自噬相关基因的角度，通过生物信息学的方法，鉴定和验证了 AH 潜在的关键生物标志物。

在本研究中，将 ARG 与 DEG 和 WGCNA 结果

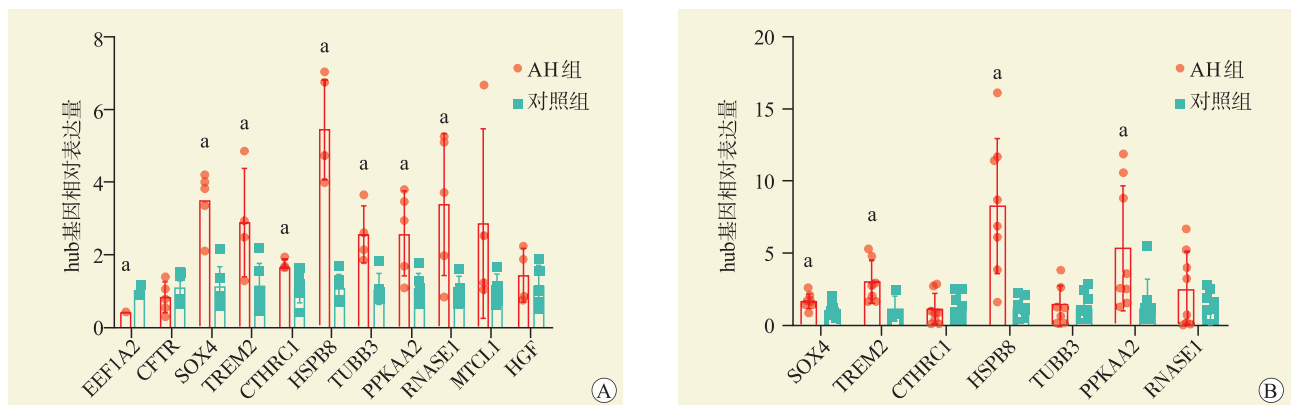


注：A 图为 mRNA-miRNA 网络图；B 图为描述 miRNA 和通路相关性的热图。

图 6 mRNA-miRNA 和 mRNA-TF 网络图
Figure 6 mRNA-miRNA and mRNA-TF network diagram

取交集，识别出 11 个上调基因。根据 KEGG 结果，DEARG 主要涉及的途径是 PI3K-Akt 信号通路、FoxO 信号通路和 Apelin 受体信号通路^[27]。PI3K-

Akt 信号传导途径参与急性酒精性脂肪肝的发生发展过程，PI3K-Akt 抑制剂可能具有治疗酒精性脂肪肝的潜力。FoxO 不仅通过激活自噬基因的转录来诱导



注：A 图为 RT-qPCR 检测 AH 组（5 例）与对照组（6 例）患者肝脏组织中 hub 基因相对表达水平；B 图为 RT-qPCR 检测 AH 组（8 只）与对照组（8 只）小鼠肝脏组织中 hub 基因相对表达水平；与对照组比较，^a $P < 0.05$ 。

图 7 RT-qPCR 验证结果

Figure 7 Results of RT-qPCR validation

自噬，还通过与自噬蛋白相互作用和通过表观遗传机制（如通过组蛋白修饰和 miRNA）来调节自噬活性^[28]。自噬也可以直接或间接地调节 FoxO 的降解^[29-30]。FoxO 转录因子可调节 Atg14 基因的表达^[31]，并对肝脏自噬和脂质代谢有着显著影响。Apelin 信号通路通过 PI3K 途径激活 AMPK 和诱导 PPAR α 生成来防止肝脏中的脂质积累^[32-33]。PPI 网络和模块分析显示，11 个关键基因与其下游基因形成紧密的相互作用，共同调控 AH 的发生发展。为充分探讨 AH 炎症细胞失调的情况，本文进行了免疫浸润分析，发现 AH 组中未成熟树突状细胞、静息肥大细胞和 M0 型巨噬细胞比例较高，而 CD8⁺T 细胞、细胞毒性 T 细胞、嗜酸性粒细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞和 Th17 比例相对较低。这几项指标都代表 AH 患者处于疾病初期，尚未发生明显的感染或炎症过敏反应，没有受体与抗原结合，尚未参与到吞噬和抗原处理的阶段，免疫应答不足。这充分说明 AH 阶段尚不严重，积极干预将会取得较好的成果。

用 GSE155907 和 GSE143318 作为验证集发现，11 个关键基因均为上调基因，且在酒精组中表达量高于对照组，与上述研究结果相同。临床相关性分析发现，CFTR 和 PPKAA2 这两个基因在酒精性肝硬化比在 AH 阶段的表达显著增高。在酒精性肝硬化中，肝细胞受到长期酒精摄入和炎症反应的刺激，导致细胞的功能和结构严重受损。为了应对这种严重的细胞损伤，细胞会通过增加自噬途径来清除受损的细胞器和蛋白质，以维持细胞的稳态。因此，在酒精性肝硬化中，自噬的活性最高。

miRNA、lncRNA 预测发现 hsa-miR-124-3p 可能是酒精性脂肪肝自噬的潜在靶点，有研究表明在肺癌的发生发展中，miR124-3p-STAT3-PRKAA 途径诱导自噬的发生^[34]。在帕金森病的发病机制中，miR-124 可调节 p62/p38 的表达，进而促进自噬^[35]。本研究中 miRNA-mRNA 调控网络分析结果提示，hsa-miR-124-3p 可能是酒精性脂肪肝自噬的潜在靶点。

随后，本研究对 AH 患者和小鼠样本进行 RT-qPCR 验证，结果显示 4 个关键基因 SOX4、TREM2、HSPB8、PPKAA2 在 AH 组中的表达量显著增高。根据已有研究，SOX4 在肥胖患者的肝脏中显著上调，可促进肝脏脂肪变性，是肝脂肪代谢的重要组成部分，可能与 AH 的发生发展有着密切的联系^[36]，而 SOX4 与自噬相关联系尚无文献报道。HSPB8 与 ATG3（自噬相关蛋白 3）相互作用，可促进自噬体-溶酶体融合^[37]，进而影响肝脏脂质代谢，从而可能参与 AH 的发生发展。PPKAA2 可以显著减少酒精引起的肝损伤并增强肝细胞的线粒体自噬水平^[38]。TREM2 通过调节肥胖及其并发症（如非酒精性脂肪性肝病）的发生和进展来影响脂质代谢^[39]，且 TREM2 可调节巨噬细胞自噬水平，进而影响动脉粥样硬化的进展^[40]，而 TREM2 与 AH 和自噬的关系还需进一步研究。这也许预示了这 4 个关键基因可能在 AH 与自噬的发生发展中起关键性作用，并可作为 AH 与自噬的潜在靶点。

综上所述，本文通过生物信息学分析识别出 11 个 AH 自噬关键上调基因（EEF1A2、CFTR、SOX4、TREM2、CTHRC1、HSPB8、TUBB3、

PRKAA2、RNASE1、MTCL1、HGF)，其中，SOX4、TREM2、HSPB8、PPKAA2 在 AH 患者和小鼠样本中都显著升高，可能是 AH 中自噬的关键基因。AH 与自噬的具体作用机制仍需进一步深入探究。

参考文献:

- [1] 刘露露, 佟静, 王炳元. 酒精性肝炎临床治疗进展[J]. 中华肝脏病杂志, 2022, 30(6): 672-675. DOI: 10.3760/cma.j.cn501113-20210102-00003.
LIU LL, TONG J, WANG BY. Progress in the clinical treatment of alcoholic hepatitis[J]. Chin J Hepatol, 2022, 30(6): 672-675. DOI: 10.3760/cma.j.cn501113-20210102-00003.
- [2] SEITZ HK, STICKEL F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis[J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(8): 599-612. DOI: 10.1038/nrc2191.
- [3] DING WX, LI M, CHEN X, et al. Autophagy reduces acute ethanol-induced hepatotoxicity and steatosis in mice[J]. Gastroenterology, 2010, 139(5): 1740-1752. DOI: 10.1053/j.gastro.2010.07.041.
- [4] PUROHIT V, GAO B, SONG BJ. Molecular mechanisms of alcoholic fatty liver[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2009, 33(2): 191-205. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2008.00827.x.
- [5] PONE EJ, ZAN H, ZHANG J, et al. Toll-like receptors and B-cell receptors synergize to induce immunoglobulin class-switch DNA recombination: relevance to microbial antibody responses[J]. Crit Rev Immunol, 2010, 30(1): 1-29. DOI: 10.1615/critrevimmunol.v30.i1.10.
- [6] ASRANI SK, DEVARBHAVI H, EATON J, et al. Burden of liver diseases in the world[J]. J Hepatol, 2019, 70(1): 151-171. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.09.014.
- [7] LEFKOWITZ JH. Morphology of alcoholic liver disease[J]. Clin Liver Dis, 2005, 9(1): 37-53. DOI: 10.1016/j.cld.2004.11.001.
- [8] TELI MR, DAY CP, BURT AD, et al. Determinants of progression to cirrhosis or fibrosis in pure alcoholic fatty liver[J]. Lancet, 1995, 346(8981): 987-990. DOI: 10.1016/s0140-6736(95)91685-7.
- [9] SINGAL AK, MATHURIN P. Diagnosis and treatment of alcohol-associated liver disease: a review[J]. JAMA, 2021, 326(2): 165-176. DOI: 10.1001/jama.2021.7683.
- [10] 李玉贤, 任锋, 陈煜. 细胞自噬对肝脏疾病代谢的调节作用研究进展[J]. 中华肝脏病杂志, 2023, 31(1): 105-108. DOI:10.3760/cma.j.cn501113-20201106-00601.
LI YX, REN F, CHEN Y. Research progress of the regulatory role of autophagy in metabolic liver diseases[J]. Chin J Hepatol, 31(1): 105-108. DOI:10.3760/cma.j.cn501113-20201106-00601.
- [11] MATHURIN P. Early liver transplantation for acute alcoholic hepatitis: we can't say no[J]. J Hepatol, 2021, 75(3): 718-722. DOI: 10.1016/j.jhep.2021.05.019.
- [12] YANG C, MEI H, PENG L, et al. Prognostic correlation of an autophagy-related gene signature in patients with head and neck squamous cell carcinoma[J]. Comput Math Methods Med, 2020: 7397132. DOI: 10.1155/2020/7397132.
- [13] VARGAS JNS, HAMASAKI M, KAWABATA T, et al. The mechanisms and roles of selective autophagy in mammals[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2023, 24(3): 167-185. DOI: 10.1038/s41580-022-00542-2.
- [14] 代倩兰, 刘绍能. 细胞自噬及其在肝纤维化中的作用[J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(6): 1440-1444. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2021.06.046.
DAI QL, LIU SN. Role of autophagy in liver fibrosis[J]. J Clin Hepatol, 2021, 37(6): 1440-1444. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2021.06.046.
- [15] LI W, HE P, HUANG Y, et al. Selective autophagy of intracellular organelles: recent research advances[J]. Theranostics, 2021, 11(1): 222-256. DOI: 10.7150/thno.49860.
- [16] KOTANI T, SAKAI Y, KIRISAKO H, et al. A mechanism that ensures non-selective cytoplasm degradation by autophagy[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 5815. DOI: 10.1038/s41467-023-41525-x.
- [17] LUCANTONI F, MARTÍNEZ-CEREZUELA A, GRUEVSKA A, et al. Understanding the implication of autophagy in the activation of hepatic stellate cells in liver fibrosis: are we there yet?[J]. J Pathol, 2021, 254(3): 216-228. DOI: 10.1002/path.5678.
- [18] MARTINEZ-LOPEZ N, SINGH R. Autophagy and lipid droplets in the liver[J]. Annu Rev Nutr, 2015, 35: 215-237. DOI: 10.1146/annurev-nutr-071813-105336.
- [19] KIM J, LEE Y, JEON T, et al. All cells are created equal in the sight of autophagy: selective autophagy maintains homeostasis in senescent cells[J]. Autophagy, 2021, 17(10): 3260-3261. DOI: 10.1080/15548627.2021.1953848.
- [20] SALETE-GRANADO D, CARBONELL C, PUERTAS-MIRANDA D, et al. Autophagy, oxidative stress, and alcoholic liver disease: a systematic review and potential clinical applications[J]. Antioxidants (Basel), 2023, 12(7): 1425. DOI: 10.3390/antiox12071425.
- [21] ZHAO C, FU Y, MA X, et al. Autophagy-based intervention strategy in the management of hepatotoxicity[J]. Antioxid Redox Signal, 2023,

- 38(16/18): 1082-1100. DOI: 10.1089/ars.2022.0051.
- [22] HOSSEINI N, SHOR J, SZABO G. Alcoholic hepatitis: a review[J]. *Alcohol Alcohol*, 2019, 54(4): 408-416. DOI: 10.1093/alcalc/aggz036.
- [23] THANDA HAN MA, PYRSOPOULOS N. Emerging therapies for alcoholic hepatitis[J]. *Clin Liver Dis*, 2021, 25(3): 603-624. DOI: 10.1016/j.cld.2021.03.006.
- [24] ZHOU JC, WANG JL, REN HZ, et al. Autophagy plays a double-edged sword role in liver diseases[J]. *J Physiol Biochem*, 2022, 78(1): 9-17. DOI: 10.1007/s13105-021-00844-7.
- [25] QIAN H, CHAO X, WILLIAMS J, et al. Autophagy in liver diseases: a review[J]. *Mol Aspects Med*, 2021, 82: 100973. DOI: 10.1016/j.mam.2021.100973.
- [26] 程金来, 周子玉, 刘丽, 等. 小鼠急性酒精性肝损伤造模方法的比较[J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(7): 26-33,40. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.07.004.
- CHENG JL, ZHOU ZY, LIU L, et al. Comparison and optimization of acute alcoholic liver injury model in mice[J]. *Chin J Comp Med*, 2023, 33(7): 26-33,40. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.07.004.
- [27] ZENG T, ZHANG CL, SONG FY, et al. PI3K/Akt pathway activation was involved in acute ethanol-induced fatty liver in mice[J]. *Toxicology*, 2012, 296(1/3): 56-66. DOI: 10.1016/j.tox.2012.03.005.
- [28] BALLESTEROS-ÁLVAREZ J, ANDERSEN JK. mTORC2: the other mTOR in autophagy regulation[J]. *Aging Cell*, 2021, 20(8): e13431. DOI: 10.1111/accel.13431.
- [29] SINHA RA. Autophagy: a cellular guardian against hepatic lipotoxicity[J]. *Genes (Basel)*, 2023, 14(3): 553. DOI: 10.3390/genes14030553.
- [30] CHENG Z. The FoxO-autophagy axis in health and disease[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2019, 30(9): 658-671. DOI: 10.1016/j.tem.2019.07.009.
- [31] GUO X, MA X, XUE L. A conserved interplay between FOXO and SNAI/snail in autophagy[J]. *Autophagy*, 2022, 18(11): 2759-2760. DOI: 10.1080/15548627.2022.2063559.
- [32] HUANG J, KANG S, PARK SJ, et al. Apelin protects against liver X receptor-mediated steatosis through AMPK and PPAR α in human and mouse hepatocytes[J]. *Cell Signal*, 2017, 39: 84-94. DOI: 10.1016/j.cellsig.2017.08.003.
- [33] GENG J, BABA M, NAIR U, et al. Quantitative analysis of autophagy-related protein stoichiometry by fluorescence microscopy[J]. *J Cell Biol*, 2008, 182(1): 129-140. DOI: 10.1083/jcb.200711112.
- [34] FaGHFOURI AH, KHAJEBISHAK Y, PAYAHOO L, et al. PPAR-gamma agonists: potential modulators of autophagy in obesity[J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 912: 174562. DOI: 10.1016/j.ejphar.2021.174562.
- [35] CHEN X, MAO R, SU W, et al. Circular RNA circHIPK3 modulates autophagy via miR124-3p-STAT3-PRKAA/AMPK α signaling in STK11 mutant lung cancer[J]. *Autophagy*, 2020, 16(4): 659-671. DOI: 10.1080/15548627.2019.1634945.
- [36] JIAO Y, ZHAO J, ZHANG Z, et al. SRY-box containing gene 4 promotes liver steatosis by upregulation of SREBP-1c[J]. *Diabetes*, 2018, 67(11): 2227-2238. DOI: 10.2337/db18-0184.
- [37] LI XC, HU QK, CHEN L, et al. HSPB8 promotes the fusion of autophagosome and lysosome during autophagy in diabetic neurons[J]. *Int J Med Sci*, 2017, 14(13): 1335-1341. DOI: 10.7150/ijms.20653.
- [38] LU X, XUAN W, LI J, et al. AMPK protects against alcohol-induced liver injury through UQCRC2 to up-regulate mitophagy[J]. *Autophagy*, 2021, 17(11): 3622-3643. DOI: 10.1080/15548627.2021.1886829.
- [39] XU YL, LIU XY, CHENG SB, et al. Geniposide enhances macrophage autophagy through downregulation of TREM2 in atherosclerosis[J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48(8): 1821-1840. DOI: 10.1142/S0192415X20500913.
- [40] LI RY, QIN Q, YANG HC, et al. TREM2 in the pathogenesis of AD: a lipid metabolism regulator and potential metabolic therapeutic target[J]. *Mol Neurodegener*, 2022, 17(1): 40. DOI: 10.1186/s13024-022-00542-y.

(收稿日期: 2023-08-24)

(本文编辑: 林佳美 吴秋玲)